



Uso de ITS ("Intergenic Transcribed Spacer") para caracterização genotípica de isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente

Glória Regina Botelho¹

Maria Cristina Prata Neves²

Gustavo Ribeiro Xavier³

Norma Gouvea Rumjanek⁴

Introdução

As *Pseudomonas* do grupo fluorescente são PGPR ("Plant Growth Promoting Rhizobacteria") ou RPCV (Rhizobacterias Promotoras do Crescimento Vegetal) de grande interesse para o controle biológico de plantas (BOTELHO, 2001; COMPANT et al., 2005). Entretanto, para a utilização de microrganismos com esta finalidade, é necessário diferentes etapas que vão desde o isolamento, caracterização fenotípica e molecular, testes *in vitro* e *in vivo*, até os testes de eficiência agrônoma. A caracterização fenotípica baseia-se na identificação e agrupamento de bactérias de acordo com a morfologia e pigmentação das colônias, reação a corantes e exigências nutricionais entre outros parâmetros. Esta caracterização exige a obtenção de culturas puras e diversos testes que demandam tempo. A utilização de kits que identificam microrganismos baseados em seus perfis metabólicos têm auxiliado no processo de identificação, devido a sua rapidez de aplicação.

A caracterização molecular baseada na análise do genoma dos organismos tem permitido maior precisão no estudo da diversidade microbiana e na identificação de microrganismos. A sequência de nucleotídeos de vários genes, especialmente da SSU ("Small-SubUnit") rRNA, tem sido bastante utilizada para identificação e classificação de microrganismos (WOESE, 1987). Algumas limitações no estudo deste gene, têm sido superadas por outras técnicas capazes de caracterizar isolados do ambiente (GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 1999). A região localizada entre 16S e 23S (ITS1) do gene rRNA é muito variável

em tamanho e sequência, mesmo entre grupos taxonômicos muito próximos. Através da análise desta região, é possível distinguir espécies ou mesmo tipos dentro de espécies (JENSEN et al., 1993). Esta variação em comprimento é decorrente, principalmente, de algumas unidades funcionais, como os genes do RNAt que podem estar presentes uma a duas vezes por espaço intergênico (NORMAND et al., 1996; GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 2001). Outras unidades funcionais compreendem sequências de reconhecimento de enzimas como as ribonuclease III e *boxA*, as quais, apesar de serem de grande importância para o funcionamento do operon, não são universalmente conservadas entre todos os microrganismos, sendo semelhante apenas entre aqueles muito similares (GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 1999). Estas unidades funcionais, geralmente, não somam mais de 50% do total do espaço. O restante da região consiste de sequências não-essenciais submetidas a eventos de inserção e deleção. É possível que por não serem funcionais, essas regiões sejam menos sujeitas às pressões evolucionárias e, conseqüentemente, poderiam ter um alto grau de variação (GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 1999).

A análise da região ITS tem sido bastante útil para estudos de comunidades de bactérias em diferentes ambientes (GONZÁLEZ et al., 2003). Neste trabalho, o grupo do Laboratório Ecologia Microbiana utilizou esta análise para caracterizar isolados de *Pseudomonas* do grupo fluorescente procedentes de plantio consorciado entre alface e cenoura do Sistema Integrado de Produção Agrícola (SIPA) apresentam potencial

¹ Eng^a Agrônoma, Dr. Bolsista da FAPERJ, Fixação de Doutor. Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ - E-mail: gloria@cnpab.embrapa.br

² Bióloga, PhD. Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ - E-mail: mcpneves@cnpab.embrapa.br

³ Eng^o Agrônomo, PhD. Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ - E-mail: gustavo@cnpab.embrapa.br

⁴ Farmacêutica, PhD. Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ - E-mail: norma@cnpab.embrapa.br

biotecnológico como promotores de crescimento vegetal e/ou agente de controle biológico.

Metodologia

Coleção de *Pseudomonas* fluorescentes

A coleção analisada, foi obtida da rizosfera (RF), rizolano (RP) e tecidos internos de raízes (ED - Endorrizosfera) de alface e cenoura cultivados em consórcio no SIPA (FONSECA, 2003).

Caracterização genotípica por análise da região ITS1

A extração do DNA dos isolados foi feita através do método descrito por XAVIER et al. (2004). A concentração de DNA foi quantificada através de espectrofotometria em aparelho Shimadzu mod. UV1201 no comprimento de onda de 260nm e diluído para se obter a concentração final de 50ng/μL. Os iniciadores (fPs16S e rPs23S) e o programa para reação de PCR utilizados foram os descritos por LOCATELLI et al. (2002). A mistura final de PCR constituiu-se de 1x tampão da enzima Taq (Invitrogen), 3mM de MgCl₂ (Invitrogen), 200μM dNTP, 2,5% formamida, 250 μM de cada um dos iniciadores e 5 U da enzima taq DNA polimerase (Invitrogen) num volume total de 30 mL. Para checar a reação, uma alíquota de 3μL foi depositada em gel de agarose 1% a 90V por 30 min. Foi utilizado o marcador de peso molecular φx174 RF DNA Hae III fragments (Invitrogen). Os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados em aparelho de fotodocumentação (IMAGO Compact Imaging System, B&L system).

O produto da reação foi cortado com a enzima de restrição TaqI (Promega, Madison). A mistura final continha volume total de 30 mL e constituiu-se de 2x tampão da enzima, 2U/μL da enzima TaqI e 6μL da reação de PCR, estabelecida pela a intensidade da banda no gel de agarose. A mistura foi colocada a 37°C por 3h, e em seguida, aplicada em gel de poliácridamida 5% a 60V por 16h. Os géis foram corados com SyberGold™ 1% e visualizados em aparelho de fotodocumentação (IMAGO Compact Imaging System, B&L system).

Os padrões de bandas foram analisados através do software Gelcompare II versão 3.5, Applied Maths, Inc., a partir dos quais foram gerados dendogramas de similaridades.

Resultados e Discussão

Os iniciadores utilizados para a análise da região ITS de *Pseudomonas* amplificaram de 1 a 2 bandas bem definidas, indicando que entre os isolados havia variação no número de cópias. As bandas possuíam tamanho em torno de 1300 a 1100 bp (Fig. 1), corroborando os resultados obtidos por LOCATELLI et al. (2002). No entanto, os autores observaram que algumas estirpes possuíam de duas a três bandas. Os dados obtidos mostraram a reproducibilidade do método, assim como sua capacidade de detectar a presença de várias cópias de ITS dentro da mesma espécie, como descrito por (GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 1999). Este conjunto de iniciadores foi escolhido por reconhecer uma região específica do gênero *Pseudomonas* (fPs16S) localizada no meio da sequência do rDNA. Os iniciadores fPs16S e rPs23S juntos foram conservados para todas as sequências de *Pseudomonas* disponíveis (LOCATELLI et al., 2002).

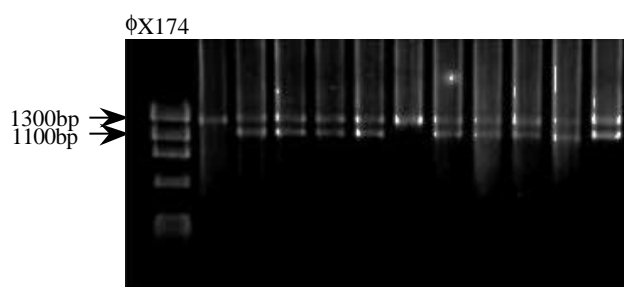


Fig. 1 – Produtos da reação de amplificação dos isolados de *Pseudomonas* utilizando os iniciadores fPs16S–rPs23S

Após a reação de PCR, os produtos obtidos foram cortados com enzima de restrição TaqI (Fig. 2). Foi observado alto grau de polimorfismo entre os isolados, com maior número de bandas entre 350bp a 1300 bp. SCARPELLINI et al. (2004) demonstraram a capacidade de diferenciar biótipos de *Pseudomonas fluorescens* através do perfil de ITS obtido pela restrição com esta enzima. A coleção de isolados é constituída, basicamente, das espécies *P. fluorescens* e *P. putida*, que são bastante semelhantes entre si (BOSSIS et al., 2000). Pela análise do dendograma foi possível observar a formação de 17 grupos distintos (Tabela 1). Certos perfis de *Pseudomonas fluorescens* obtidos assemelhavam-se mais a alguns de *P. putida*. Estes resultados indicam alta similaridade entre as espécies, ao mesmo tempo que comprovam a grande variabilidade intraespecífica. O alto polimorfismo sugeriu, também, que as práticas

culturais alternativas exercidas na "Fazendinha" influenciaram na diversidade de *Pseudomonas* do grupo fluorescente. Sabe-se que certas práticas, como a rotação de culturas, as quais são amplamente adotadas no SIPA, podem induzir mudanças na comunidade bacteriana, tornando o solo supressivo à doença de plantas, conforme demonstrado por PETERS et al., 2003).

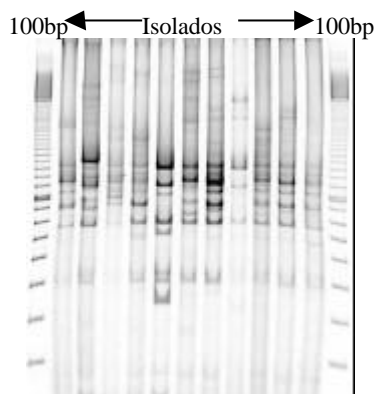


Figura 2 – Restrição da região ITS1 de *Pseudomonas* do grupo fluorescente utilizando enzima TaqI.

Tabela 1 – Distribuição de indivíduos nos grupos formados e percentual de similaridade entre os indivíduos.

Grupos	Número de indivíduos	Similaridade (%)
A	6	52
B1	4	71
B2	3	73
B3	8	75
B4	3	82
B5	3	72
B6	11	68
C1	5	58
C2	10	64
C3	2	76
D	1	48
E	1	50
F	1	50
G	3	50
H	3	54
I	2	44
J	1	24

Através do dendograma, foi possível selecionar grupos que continham isolados com especificidade para plantas e/ou compartimentos da raiz (Fig.3). Observou-se que o grupo A foi formado por bactérias do rizoplano e endorizosfera das duas espécies vegetal. O grupo B2 foi constituído por isolados do rizoplano de alface e rizosfera e rizoplano de cenoura.

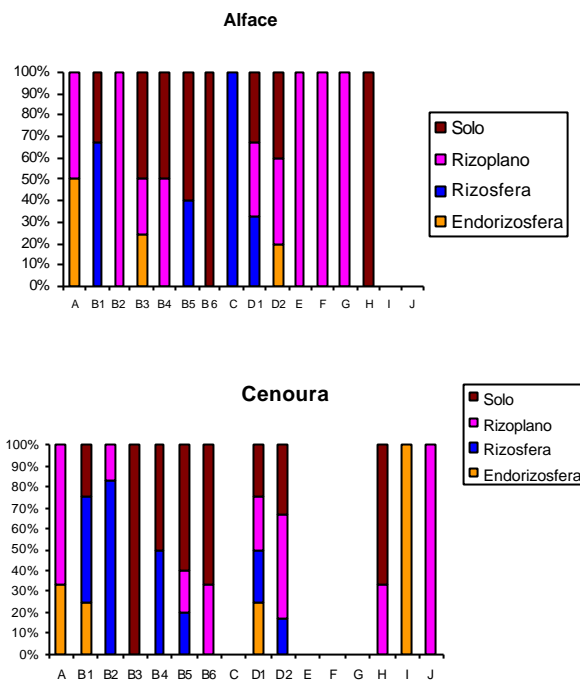


Figura 3 - Distribuição dos grupos entre plantas e compartimentos da raiz

Outros grupos apresentaram especificidade por compartimento da raiz e planta, já como os grupos E, F e G, estes foram compostos apenas por isolados do rizoplano de alface. Este tipo de resultado pode auxiliar na escolha de promotores de crescimento vegetal e/ou agentes do controle biológico como resultado do nicho ecológico e especificidade na interação planta e bactéria, para uso em inoculantes, já que isolados mais adaptados ao ambiente radicular teriam maior capacidade de sobrevivência e competitividade, potencializando a eficiência da inoculação.

Referências Bibliográficas

BOSSIS, E.; LEMANCEAU, P.; LATOUR, X.; GARDAN, L. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. **Agronomie**, Paris, v. 20, p. 51- 63, 2000.

BOTELHO, G. R. **Seleção de *Pseudomonas* fluorescentes para controle biológico da podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani* em soja (*Glycine max* L.).** 2001. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

FONSECA, M. C. **Diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA)**. 2003. 136 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

GARCÍA-MARTINEZ, J.; ACINAS, S. G.; ANTÓN, A. I.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Use of 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 36, p. 55-64, 1999.

GARCÍA-MARTINEZ, J.; BESCÓS, I.; RODRÍGUEZ-SALA, J. J.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. RISSC: a novel database for ribosomal 16S-23S RNA genes spacer regions. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 178-180, 2001.

GONZÁLEZ, N.; ROMERO, J.; ESPEJO, R. T. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer region. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 55, p. 91-97, 2003.

JENSEN, M. A.; WEBSTER, J. A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacterial on the basis of polymerase chain reaction amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 4, p. 945-952, 1993.

LOCATELLI, L.; TARNAWSKI, S.; HAMELIN, J.; ROSSI, P.; ARAGNO, M.; FROMIN, N. Specific PCR amplification for the genus *Pseudomonas* targeting the 3' half of 16S rDNA and the whole 16S-23S rDNA spacer. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 25, p. 220-227, 2002.

NORMAND, P.; PONSONNET, C.; NESME, X.; NEYRA, M.; SIMONET, P. ITS analysis of prokariotes. In: AKKERMANS, D. L.; VAN ELSAS, J. D.; BRUIJN, F. J. (Org). **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer, 1996. p. 1-12.

PETERS, R. D.; STURZ, A. V.; CARTER, M.; SANDERSON, J. B. R. Developing disease-suppressive soils through crop rotation and tillage management practices. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 72, p. 181-192, 2003.

SCARPELLINI, M.; FRANZETTI, L.; GALLI, A. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 236, p. 257-260, 2004.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987.

XAVIER, G. R.; SILVA, F. V.; ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G. **Adaptação de método para extração de DNA de microrganismos associados a raízes de plantas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2004. 24 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 171).

Comunicado Técnico, 80

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia
BR465 – km 7
Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil
Telefone: (0xx21) 2682-1500
Fax: (0xx21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

1ª impressão (2005): 50 exemplares



Comitê de publicações

Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Elen de Lima Aguiar-Menezes e Kátia Regina dos Santos Teixeira
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix.
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia.